

C-3 epimer cukoraminosavak és új típusú foldamereik szintézise, szerkezetvizsgálata

Doktori értekezés tézisei



Nagy Adrienn

Témavezető:

Prof. Dr. Perczel András

D.Sc., egyetemi tanár, MTA rendes tagja

Hevesy György Kémia Doktori Iskola

Vezető: Prof. Dr. Császár Attila

Szintetikus kémia, szerves és biomolekuláris kémia doktori program

Vezető: Prof. Dr. Perczel András

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Természettudományi Kar, Kémiai Intézet

Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratórium

Budapest, 2019

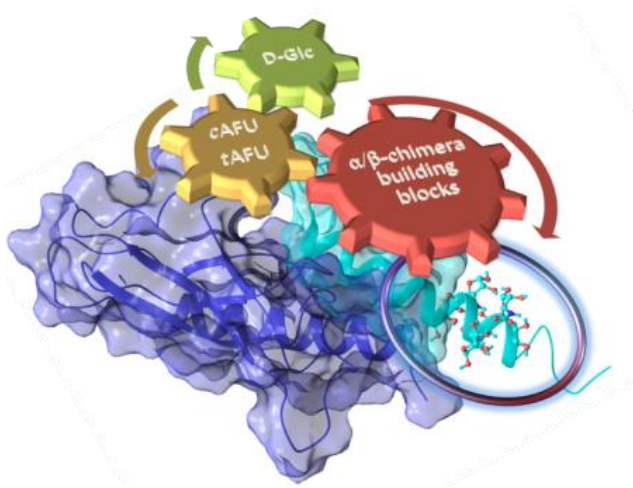
I. Bevezetés és célkitűzések

Az utóbbi évtizedek során a polipeptidek és fehérjék jelentősége megnőtt a gyógyszerkutatás terén is. Felmerült ezért az az igény, hogy olyan mesterséges molekulákat hozzunk létre, amelyek önszerveződően, jól definiálható, specifikus és előre tervezhető térszerkezet felvételére képesek, miközben a fehérjékkel analóg tulajdonságaikat megőrzik. A foldamerkémia így vált az elmúlt 30 évben az orvostudományok, a farmakológia és biológiai kutatások meghatározó területévé.

Alkalmas foldamer monomereknek bizonyultak mind a nyílt láncú, mind a cikloalkán gyűrűs β -aminosavak megfelelő származékai, köztük a cukoraminosavak. Ezen vegyülettípusok nagy előnye, hogy a belőlük felépülő peptidek a β -peptidkötés miatt a szervezetben sokkal ellenállóbbak lesznek a szokásos α -aminosavak polimerjeit bontó enzimekkel szemben. A cukoraminosavak további előnyös tulajdonsága, hogy megnövelik a belőlük képződő oligo- és polimerek, valamint foldamerek vízdoldhatóságát. Hidroxilcsoportjaik révén változatosan szubsztituálhatók, továbbá másodlagos szerkezeti elemekbe rendeződő molekuláris hajlandóságot mutatnak.

Doktori munkám egyik fő célja két C-3 epimer furanóz gyűrűs β -aminosav totálszintézisének kidolgozása volt, minden egyes reakciólépés optimalizálásával, a kritikus lépések részletes körüljárásával, hogy a monomerek előállítása nagyméretben is gazdaságos és hatékony legyen.

Az előállított β -cukoraminosavak lehetőséget teremtenek, hogy feltérképezsem azok peptidkapcsolási tulajdonságait. Ehhez először diamid modell vegyületeken terveztem megvizsgálni a molekulák C- és N-terminálisának alkalmasságát amidkötés létesítésére. Ezt követően a peptidkapcsolás körülményeit szerettem volna részletesen körüljárni, hogy optimalizáljam a cukoraminosavakat tartalmazó peptidek szintézisét. α/β -



1. ábra Az Exendine-4 variálható szakaszának módosítására alkalmas β -cukoraminosavat tartalmazó α/β -kiméra peptidek felépítése. A β -cukoraminosavak előállításának kiindulási anyaga az α -D-glükóz.

Hetero- és β/β -homooligomerek előállításával a cukrok α -aminosavakkal és önmagukkal való kapcsolási tulajdonságainak feltérképezése is célom volt.

Az előállított diamid modellvegyületek, homo- és heterooligomerek másodlagos térszerkezet felvételére irányuló hajlamát, illetve a cukorgyűrű által indukált konformációváltozást kiroptikai spektroszkópiával, valamint a homooligomereket 2D NMR spektroszkópiával terveztem megvizsgálni. Az oligomerek által felvett másodlagos szerkezet fontos olyan szempontból is, hogy mint foldamerek alkalmasak lesznek-e az Exendine-4 minifehérje variálható szakaszának jövőbeli módosítására.

II. Alkalmazott módszerek

Az azido-cukorszármazékok redukcióját az áramlásos rendszerű H-Cube Mini[®] készülékkel 10% Pd/C katalizátort alkalmazva valósítottam meg. A peptideket manuális szilárd fázisú peptidszintézissel, valamint az áramlásos rendszerű peptidszintetizátorral állítottam elő (Fmoc/^tBu stratégia, 2-Cl-Trt-Cl gyanta). A peptidkapcsolások sikerességét Kaiser-tesztel ellenőriztem, a gyantakapacitást pedig UV spektroszkópiával határoztam meg.

A szénhidrátszármazékok és a peptidek azonosítása ESI-MS, FTIR, RP-HPLC, valamint ¹H-, ¹³C-, ³¹P-NMR (250 MHz, CDCl₃, D₂O, DMSO-*d*₆, DMF-*d*₇) módszerekkel történt. A peptidek tisztítását RP-HPLC-vel végeztem el, szerkezetvizsgálatuk pedig 2D NMR (COSY, TOCSY, ROESY, NOESY, 700 MHz, D₂O, MeOH-*d*₃) mérésekkel történt. A molekulák kiroptikai tulajdonságainak felderítésére ECD és VCD spektroszkópiát alkalmaztam (2x desztillált H₂O, MeOH, CH₃CN).

A modellvegyületek konformációs sokaságának meghatározására és a stabil konformerek VCD és ECD spektrumának predikciójára sűrűségfunkcionál (DFT) alapú *ab initio* számításokat alkalmaztunk.

III. Új tudományos eredmények

1. C-3 epimer β-cukoraminosavak szintézise

Kutatómunkám során két C-3 epimer furanóz gyűrűs β-cukoraminosav, az 1,2-*O*-izopropilidén-*N*-(9-fluorenil-metoxi-karbonil)-3-amino-3-dezoxi-α-D-ribofuran-uronsav (Fmoc-RibAFU(ip)-OH) és az 1,2-*O*-izopropilidén-*N*-(9-fluorenil-metoxi-karbonil)-3-amino-3-dezoxi-α-D-xilofuran-uronsav (Fmoc-XylAFU(ip)-OH), mint új foldamer monomer, méretnövelt, gazdaságos totálszintézisét dolgoztam ki. Az α-D-glükózból kiinduló 7, illetve 8 lépéses szintézissorok minden lépését nagyméretben is optimalizáltam a reakcióidő, a termelés és a költségigény szempontjából. A szintézisek kritikus lépése az *N*-terminális kiépítése,

amelyet a *ribo* származék előállításánál részletesen körüljártam és azt találtam, hogy a 3-*O*-(imidazol-1-szulfonil)-származékon keresztül történő reakció alkalmas a méretnövelésre. A *xilo* származék előállításánál további kritikus lépés volt a *glüko* → *allo* konverzió, amelyre a Swern oxidáció bizonyult a legjobb megoldásnak. A nagy mennyiségben előállított monomerek pedig lehetőséget adtak a peptidkapcsolási reakciók tesztelésére, valamint változatos peptidszekvenciák felépítésére.

2. A cukoraminosavak szilárd fázisú peptidszintézisének optimalizálása

A szilárd fázisú peptidszintézis körülményeinek optimalizálásának első lépése az alkalmas monomer kiválasztása volt. A *ribo* származékkal az Fmoc-védett β -cukoraminosav mellett annak prekursorát, az azido-karbonsav molekulát is teszteltem és azt találtam, hogy az azidocsoport redukciója a Staudinger reakcióval és az azt követő hidrolízissel gyantán nehézségekbe ütközik. Stabil foszfinimin származék képződött, amely csak részben volt elhidrolizálható aminná. Tehát a kapcsolási reakciókat az Fmoc-karbonsavval érdemes elvégezni. Ezt követően az optimalizálási folyamat része volt többek között az alkalmas gyanta kiválasztása, a megfelelő kapcsolási idő meghatározása, a különböző kapcsoló reagensekkel kialakuló aktív észterek kialakulásának és stabilitásának vizsgálata ^1H NMR spektroszkópiával, valamint az optimális védőcsoport hasítás körülményeinek kidolgozása. A teszt reakciókhoz a -GGXGG-, valamint -GXXG- modell szekvenciákat építettem fel négy kapcsoló reagenst kipróbálva. A kapcsolási hatékonyságokat összevetve a PyBOP/DIEA rendszerrel való kapcsolás bizonyult a legjobbnak. Mivel egy piranózgyűrűs β -cukoraminosav, az Fmoc-GlcAPU(Me)-OH, amely eltérő szerkezetű és tulajdonságú, esetén is ugyanazt az eredményt kaptuk, így azt mondhatjuk, hogy ezen kapcsoló reagenst érdemes használni cukoraminosavat tartalmazó peptidek szintézisének.

3. Homooligomerek felépítése és szerkezetvizsgálata

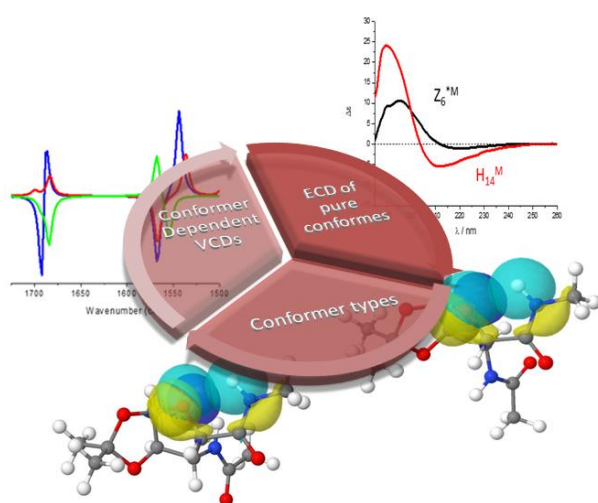
Az Fmoc-ribofurán-uronsavból az optimalizált körülményekkel szilárd fázison β/β -homooligomereket, tetramert és hexamert építettem fel, majd vizsgáltam azok szerkezetét ECD és 2D NMR módszerekkel. A vízben mért ECD spektrumok azt mutatták, hogy a cukoraminosavat tartalmazó oligomerek a β -peptidekhez hasonló szerkezeti preferenciával rendelkeznek. Megfigyelhető volt továbbá, hogy a cukoraminosav egységek számának növelésével nőtt a spektrum intenzitása. A hőmérsékletfüggő mérések pedig azt mutatták, hogy a szerkezet 5 °C-on a legstabilabb. A hexamer molekuláról $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ rendszerben pH = 4,09-en mért 2D NMR spektrumok segítségével sikerült asszignálni az egyes monomereket, viszont

a ROESY spektrumból nem lehetett annyi keresztcsúcsot kinyerni, hogy meghatározzuk a pontos térszerkezetet.

4. α - és β -aminosavból képzett aktív észterek stabilitásának vizsgálata

A szilárd fázisú peptidszintézis optimalizálására adhat lehetőséget az aminosavakból kialakuló aktív észterek képződésének és stabilitásának ismerete. Ehhez ^1H NMR segítségével szisztematikusan megvizsgáltunk különböző α - és β -aminosavakat a cukoraminosavaknál legeredményesebbnek bizonyult PyBOP/DIEA reagens párt használva. Az aktív észter hidrolízisének sebessége alapján három csoportba sorolhatók a vizsgált aminosavak, ráadásul az egy csoportba tartozó aminosavak nagyon hasonló szerkezeti tulajdonságokkal rendelkeznek: *i*) gyorsan hidrolizáló aktív észter, β - vagy γ -elágazás nélküli reaktív aminosavak (pl. Gly, Ala), *ii*) lassan hidrolizáló aktív észter, β - vagy γ -elágazással rendelkező kevésbé reaktív aminosavak (pl. Thr, Ile), *iii*) stabil aktív észter, kevésbé reaktív aminosavak merev szerkezettel illetve nagy oldallánccal (pl. ACPC, β^3 -Val). A kinetikai modellek jó egyezést mutattak a mért eredményekkel, továbbá a kinetikai számítások segítségével meghatároztuk a hidrolízis felezési idejét és az aktív észter koncentrációját a hidrolízis kezdetekor. A képződési és stabilitási adatok fontossága pedig abban rejlik, hogy ezek alapján az egyes aminosavak kapcsolását optimális körülmények között tudjuk elvégezni, magas kapcsolási hatékonyságot eredményezve ezáltal.

5. Diamid modellvegyületek szerkezetvizsgálata VCD/ECD spektroszkópiát és *ab initio* számításokat ötvöző módszerrel



2. ábra Diamid modellvegyületek VCD és ECD spektrumának asszignációja és másodlagos szerkezetének felderítése a mért és a számított spektrumok összehasonlításával.

β -Peptidek esetén a másodlagos szerkezet meghatározására használt ECD/NMR és ECD/NMR/röntgen kombinált módszerek alkalmazásának számos korlátja van. Így elsődleges célunk volt egy olyan VCD/ECD spektroszkópiát és *ab initio* számításokat ötvöző módszer kidolgozása, amely általánosan használható szerkezet meghatározásra. Módszerünk tesztelésére diamid modellvegyületeket használtunk, melyek másodlagos szerkezeti hajlamát sikeresen meghatároztuk. A vizsgált

modellek érdekessége, hogy amíg a monometil-amidcsoportot tartalmazó molekulákat belső H-híd stabilizálja, addig a dimetil-amidcsoportot tartalmazó származékoknál a beépülő metilcsoport szterikus gátlást okoz. Ezen szerkezeti változás nagyon jól követhető ECD és VCD spektroszkópiával. A kidolgozott módszer alkalmas kísérleti VCD és ECD spektrumok asszignációjára, valamint szerkezet meghatározásra és mivel nem igényel komoly számítási kapacitást és/vagy bonyolult spektroszkópiai műszerezettséget gyorsan a peptidkémia alapeszközüvé válhat.

IV. Az új eredmények jelentősége

Doktori munkám során megvalósítottam két C-3 epimer furanóz gyűrűs β -aminosav nagyméretben is optimált totálszintézisét, valamint ezen vegyületek kapcsolási tulajdonságainak a tesztelésével és az ezeket tartalmazó homo- és heterooligomerek előállításával és szerkezetvizsgálatával foglalkoztam. Az elért eredmények bővítik a foldamerkémia és a szilárd fázisú peptidszintézis ismerettárát. A hidrofíl tulajdonságú β -peptidek pedig lehetőséget adnak, hogy beépítsük őket az Exendine-4 variálható szakaszába. Ezáltal jobb oldhatósági és farmakológiai (elsősorban farmakodinamikai) tulajdonságok érhetők el, amelyek alkalmassá tehetik a molekulát a II. típusú cukorbetegség jövőbeli kezelésére.

V. Közlemények és előadások jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. B. Csordás, A. Nagy, V. Harmat, V. Zsoldos-Mády, I. Leveles, I. Pintér, V. Farkas, A. Perczel, Origin of problems related to Staudinger reduction in carbopeptoid syntheses. *Amino Acids* **2016**, 48, 2619-2633.
2. A. Nagy, B. Csordás, V. Zsoldos-Mády, I. Pintér, V. Farkas, A. Perczel, C-3 epimers of sugar amino acids as foldameric building blocks: improved synthesis, useful derivatives, coupling strategies. *Amino Acids* **2017**, 49, 223-240.
3. A. Nagy, V. Goldschmidt Göz, I. Pintér, V. Farkas, A. Perczel, α/β -Chimera peptide synthesis with cyclic β -sugar amino acids: the efficient coupling protocol. *Amino Acids* **2019**, 51, 669-678.

4. V. Farkas, A. Nagy, D. K. Menyhárd, A. Perczel, Assignment of vibrational circular dichroism cross-referenced electronic circular dichroism spectra of flexible foldamer building blocks: towards assigning foldamers' pure chiroptical properties.
Chem. Eur. J. **2019**, DOI: 10.1002/chem.201903023.
5. V. Goldschmidt Göz, A. Nagy, V. Farkas, E. Keszei, A. Perczel, Unwanted hydrolysis or α/β -peptide bond formation: How long the rate-limiting coupling step should take?
RSC Advances **2019**, közlésre elfogadva

Előadások és poszterek

1. Nagy A., Zsoldos-Mády V., Pintér I., Perczel A., Foldamer prekursor 3-amino-3-dezoxi-D-ribofurán-uronsav származékok szintézise
XIX. Nemzetközi Vegyészkonferencia, poszter, Nagybánya, Románia, 2013. november
2. Nagy A., 3-Amino-3-dezoxi-D-ribofurán-uronsav származékok szintézise
Kari Kémiai Tudományos Diákköri Konferencia, ELTE TTK, Budapest, 2013. december
3. Nagy A., Zsoldos-Mády V., Pintér I., Perczel A., Foldamer prekursor 3-amino-3-dezoxi-D-ribofurán-uronsav származékok szintézise
Annual Meeting of the Working Committee for Carbohydrates, Nucleic Acids and Antibiotics of the Hungarian Academy of Science, előadás, Mátraháza, 2014. május
4. Nagy A., 3-Amino-3-dezoxi-D-ribofurán-uronsav származékok szintézise
XXXII. OTDK Kémiai és Vegyipari Szekció, Veszprém, 2015. április
5. A. Nagy, V. Zsoldos-Mády, I. Pintér, V. Farkas, A. Perczel, Approaches to new peptidomimetics with 3-amino-3-deoxy-D-ribofuranuronic acid
Annual Meeting of the Working Committee for Carbohydrates, Nucleic Acids and Antibiotics of the Hungarian Academy of Science, előadás, Mátraháza, 2015. május

6. Nagy A., 3-Amino-3-dezoxi-D-ribofurán-uronsav származékok szintézise és beépítése α/β -peptidekbe
PhD beszámolónap, ELTE TTK, Budapest, 2015. november
7. A. Nagy, B. Csordás, D. K. Menyhárd, V. Harmat, V. Zsoldos-Mády, V. Farkas, I. Pintér, A. Perczel, Novel peptidoglycans synthesized from furanoid sugar amino acids. Interpretation of the unexpected stability of phosphinimino-furanoses
Debrecen Colloquium on Carbohydrates 2015, András Lipták Memorial Conference, előadás, Debrecen, 2015. november
8. Nagy A., 3-Amino-3-dezoxi-D-ribofurán-uronsav származékok szintézise és beépítése α/β -peptidekbe
ELTE, Szerves Kémiai Tanszék, tanszéki értekezlet, előadás, 2016. március
9. Farkas V., Nagy A., Goldschmidt Gőz V., Mándity I., Új módszer a láthatáron: peptid alapú hatóanyagok, szubsztrátok gazdaságos és gyors szintézise áramlós rendszerű peptidszintézis készülékkel
MEDinPROT konferencia, poszter, Budapest, 2017. április
10. V. Farkas, A. Nagy, D. K. Menyhárd, A. Perczel, Discovering chiroptical properties of sugar amino acids building blocks
16th International Conference on Chiroptical Spectroscopy, poszter, Rennes, Franciaország, 2017. június
11. A. Nagy, V. Zsoldos-Mády, I. Pintér, V. Farkas, A. Perczel, Foldameric building block C-3 epimer sugar amino acids
19th European Carbohydrate Symposium, poszter, Barcelona, Spanyolország, 2017. július
12. Nagy A., Zsoldos-Mády V., Pintér I., Farkas V., Perczel A., Foldamerépítő C-3 epimer cukoraminosavak
Pillich Lajos Miniszipórium, Richter Gedeon Nyrt., előadás, Budapest, 2018. február

13. Nagy A., Goldschmidt Gőz V., Pintér I., Farkas V., Perczel A., GXXG modell peptid felépítése foldamerépítő β -cukoraminosavakból
Peptidkémiai Munkabizottság Tudományos Ülése, előadás, Balatonszemes, 2018. május
14. V. Goldschmidt Gőz, A. Nagy, V. Farkas, I. Pintér, A. Perczel, Puzzle pieces: C-4 and C-3 epimer β -SAAs as new building blocks of foldamers
9th Conference, Chemistry towards Biology, előadás, Budapest, 2018. szeptember
15. I. Varga, A. Nagy, V. Goldschmidt Gőz, I. Pintér, A. Perczel, Synthesis of Fmoc protected β -sugar amino acid foldamer monomers
International Workshop on Chemistry and Chemical Biology of Carbohydrates, Nucleic Acids and Antibiotics, előadás, Mátrafüred, 2019. május